

***Phenacoccus madeirensis* Green: monitorização em
cafeeiro e interação com o parasitoide *Anagyrus amnestos***

José Maria Sarreira Nunes de Oliveira

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Agronómica

Orientadores: Professor Doutor José Carlos Franco Santos Silva

Doutora Elsa Maria Borges da Silva

Júri:

Presidente: Doutor Henrique Manuel Filipe Ribeiro, Professor Auxiliar do Instituto Superior de
Agronomia da Universidade de Lisboa

Vogais: Doutor José Carlos Franco Santos Silva, Professor Auxiliar do Instituto Superior de
Agronomia da Universidade de Lisboa

Doutora Elisabete Tavares Lacerda de Figueiredo Oliveira, Professora Auxiliar do Instituto
Superior De Agronomia da Universidade de Lisboa

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer aos meus pais e ao meu irmão Francisco por todo o apoio incondicional, pela paciência e por tudo o que me proporcionaram até hoje na minha vida.

Aos meus orientadores, Professor Doutor José Carlos Franco e Doutora Elsa Maria Borges da Silva por todo o acompanhamento e disponibilidade ao longo de todo este percurso.

Ao Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro (CIFC), nomeadamente à Dra. Maria do Céu Silva e ao Eng. Vítor Várzea, por terem apoiado a realização deste estudo, e em particular à Dra. Ana Paula de Mira do Carmo Pereira, pela disponibilidade e apoio no trabalho desenvolvido nas respetivas estufas de cafeeiro.

À Mestre Vera Zina, à Mestre Catarina Mourato e ao Mestre Gonçalo Duarte por toda a ajuda e companhia durante horas infindáveis de trabalho no laboratório, na assistência imprescindível durante a criação dos insetos e pelo apoio nos ensaios efetuados em campo.

E, finalmente, a todos os meus amigos e colegas de curso que durante seis anos de vida académica proporcionaram memórias e amizades que perdurarão até ao fim dos meus dias.

Resumo

O objetivo deste trabalho foi estudar a dinâmica de infestação de *Phenacoccus madeirensis* em cafeeiro, em estufa, e sua interação com o parasitoide *Anagyrus amnestos*. Procedeu-se à monitorização de cochonilhas-algodão, numa estufa do Centro de Investigação de Ferrugens do Cafeeiro, em Oeiras, entre setembro de 2016 e novembro de 2017. Foram colhidas amostras para determinação da taxa de parasitismo, por *A. amnestos*. A especificidade do parasitoide foi estudada, através de ensaios biológicos, sem escolha, em placa de Petri, expondo, durante períodos de 30 minutos, uma fêmea do parasitoide, previamente fecundada, a 10 fêmeas jovens ou 3º instares de uma de três espécies de cochonilhas-algodão: *P. madeirensis*, *Planococcus ficus* (Signoret) e *Pseudococcus calceolariae* (Maskell). Foram realizadas 40 repetições.

A percentagem de plantas infestadas variou entre 0,6% e 56,9%. Foram identificadas três espécies de cochonilhas-algodão: *Planococcus citri* (Risso), *P. madeirensis* e *Pseudococcus longispinus* (Targioni Tozzetti). *Planococcus citri* foi a espécie mais frequente. *Phenacoccus madeirensis* foi a segunda espécie mais frequente. A taxa de parasitismo por *A. amnestos* variou entre 1% e 100%, com um valor médio de 19%. *Anagyrus amnestos* só parasitou *P. madeirensis*, tendo rejeitado como hospedeiros *P. ficus* e *P. calceolariae*. A proporção do tempo de procura do parasitoide representou cerca de 47%, no caso de *P. madeirensis*, em comparação com mais de 80%, em *P. ficus* e *P. calceolariae*. A percentagem de tempo de antenação também permite diferenciar a espécie hospedeira. No caso de *P. madeirensis*, este comportamento (6,5%) representou cerca de três a quatro vezes mais a percentagem de tempo alocado pelo parasitoide no caso da interação com *P. calceolariae* (2,1%) e *P. ficus* (1,5%), respetivamente.

Palavras-chave: Cochonilhas-algodão; *Phenacoccus madeirensis*; *Anagyrus amnestos*; luta biológica; cafeeiro

Abstract

The objective of this work was to study the dynamics of *Phenacoccus madeirensis* infestation in coffee, in greenhouse, and its interaction with the parasitoid *Anagyrus amnestos*. Mealybugs were monitored in a greenhouse at Centro de Investigação de Ferrugens do Cafeeiro, in Oeiras, between September 2016 and November 2017. Samples were taken to determine the rate of parasitism by *A. amnestos*. The specificity of the parasitoid was studied by means of non-choice tests in Petri dish arenas, exposing, for periods of 30 minutes, one mated female of the parasitoid, to 10 young females or 3rd instars of one of three mealybug species: *P. madeirensis*, *Planococcus ficus* (Signoret) and *Pseudococcus calceolariae* (Maskell). The bioassay was replicated 40 times.

The percentage of infested plants ranged from 0.6% to 56.9%. Three mealybug species were identified: *Planococcus citri* (Risso), *P. madeirensis* and *Pseudococcus longispinus* (Targioni Tozzetti). *Planococcus citri* was the most frequent species. *Phenacoccus madeirensis* was the second most frequent species. The parasitism rate for *A. amnestos* ranged between 1.1% and 100%, with an average of 19%. *Anagyrus amnestos* only parasitized *P. madeirensis*, having rejected *P. ficus* and *P. calceolariae* as hosts. The proportion of searching time of the parasitoid represented about 47%, in the case of *P. madeirensis* compared to more than 80% in *P. ficus* and *P. calceolariae*. The percentage of time of antennation also allows to differentiate the host species. In the case of *P. madeirensis*, this behavior (6.5%) represented about three to four times the percentage of time allocated by the parasitoid, in the case of the interaction with *P. calceolariae* (2.1%) and *P. ficus* (1.5%), respectively.

Key words: Mealybugs; *Phenacoccus madeirensis*; *Anagyrus amnestos*; biological control; *Coffea*

Índice

Índice de figuras	vii
Índice de quadros	viii
1. Introdução	1
2. Material e métodos	3
2.1. Monitorização de <i>Phenacoccus madeirensis</i> em cafeeiro	3
2.1.1. Caracterização da parcela	3
2.1.2. Amostragem	4
2.2. Especificidade do parasitoide <i>Anagyrus amnestos</i>	5
2.2.1. Origem do material biológico	5
2.2.2. Criação dos hospedeiros e do parasitoide	6
2.2.3. Ensaio biológico.....	6
2.4. Análise de resultados	8
3. Resultados e discussão	9
3.1. Monitorização de cochonilhas-algodão em cafeeiro.....	9
3.2. Taxa de parasitismo de <i>Phenacoccus madeirensis</i>	13
3.3. Estudo comportamental do parasitoide <i>Anagyrus amnestos</i>	13
4. Conclusões.....	17
5. Referências bibliográficas.....	18

Índice de figuras

Figura 1 - Sinais de parasitismo em <i>Phenacoccus madeirensis</i> , Ampliação 20x Leica MZ6..	2
Figura 2 - Planta de cafeeiro envasada, na parcela em que decorreu o estudo.	3
Figura 3 - Cochonilha-algodão <i>Phenacoccus peruvianus</i> com sinais de parasitismo Ampliação 15x Leica MZ6.	5
Figura 4 - Amostra com presença de <i>P. madeirensis</i>	6
Figura 5 - Esquema da montagem do ensaio comportamental de <i>A. amnestos</i> . O círculo branco delimitado a preto representa uma placa de Petri de 20 cm; a cinzento estão representadas as fêmeas de cochonilha-algodão selecionadas para a ensaio; e a vermelho o local inicial de introdução do parasitoide.	7
Figura 6 - Evolução da percentagem de plantas infestadas com cochonilhas-algodão, durante o período de amostragem (setembro de 2016 a novembro de 2017).	9
Figura 7 - Índice médio de infestação de cochonilhas-algodão ao longo do período de observação.....	10
Figura 8 - Reta da regressão linear entre o índice de infestação (eixo das ordenadas) e a percentagem de plantas infestadas (eixo das abcissas).....	11
Figura 9 - Evolução da frequência relativa de cada uma das três espécies de cochonilhas- algodão identificadas na parcela de cafeeiro em estudo: <i>Planococcus citri</i> , <i>Phenacoccus</i> <i>madeirensis</i> , <i>Pseudococcus longispinus</i>	12
Figura 10 - Frequência relativa da duração de cada comportamento de localização e reconhecimento do hospedeiro por parte do parasitoide <i>Anagyrus amnestos</i> [1 – procura; 2 – antenação; 3 – sondagem; 4 – oviposição; 5- limpeza e descanso], quando exposto a três espécies distintas de cochonilhas-algodão [PH - <i>Phenacoccus madeirensis</i> , F - <i>Planococcus</i> <i>ficus</i> , P.CAL - <i>Pseudococcus calceolariae</i>].....	14
Figura 11 - Cochonilha-algodão <i>Phenacoccus madeirensis</i> Green parasitada por <i>Anagyrus</i> <i>amnestos</i> , Ampliação 15x Leica MZ6.	16

Índice de quadros

Quadro 1 - Espécies de cochonilhas-algodão selecionadas por Chong & Oetting (2007c), no estudo de especificidade do parasitoide <i>Anagyrus amnestos</i>	5
Quadro 2 - Taxa de parasitismo (%) por <i>Anagyrus amnestos</i> em amostras de <i>Phenacoccus madeirensis</i> colhidas em cafeeiro (A= número da amostra), no CIFC, em Oeiras (N= fêmeas N3 e adultas de <i>P. madeirensis</i>).....	13
Quadro 3 - Duração média (\pm erro padrão) dos comportamentos de seleção do hospedeiro (em segundos), de fêmeas de <i>Anagyrus amnestos</i> , quando expostas a três espécies de cochonilhas-algodão de três géneros diferentes, em ensaios biológicos, sem escolha, realizados em placa de Petri, durante 30 minutos.	15

1. Introdução

As cochonilhas-algodão (Hemiptera: Pseudococcidae) são uma das principais pragas em culturas hortícolas e ornamentais, a nível mundial (Williams & Granara de Willink 1992; Beltrà & Soto 2011). Representam a segunda maior família de cochonilhas, com mais de 2000 espécies descritas e 260 géneros (Ben-Dov, 2016).

As cochonilhas são insetos invasores notáveis, porque apresentam pequenas dimensões e comportamento críptico, levando a que muitas vezes sejam transportadas em vários produtos que circulam, através do comércio internacional (Miller et al., 2002). Os estragos que provocam incluem, para além da extração de seiva, a excreção de melada e desenvolvimento associado de fungos saprófitas (fumagina), fitotoxidade resultante da injeção de saliva nos tecidos do hospedeiro e transmissão de vírus (Franco et al., 2009; Bugila et al., 2013).

Entre as diversas espécies de cochonilhas-algodão, *Phenacoccus madeirensis* Green, de origem neotropical, tem vindo a assumir importância crescente em diversos países, como praga de culturas hortícolas protegidas e ornamentais, entre outras (Pellizzari & Germain, 2010). Em Portugal, esta espécie foi referenciada na região do Oeste, em culturas protegidas (Franco et al., 2011; Canário, 2016) e em estufas de cafeeiros (*Coffea arabica* L.), em Oeiras (Andrade, 2014; Andrade et al., 2017). Trata-se de uma espécie polífaga, assinalada em plantas de cerca de 131 géneros e 51 famílias (Ben-Dov, 2016).

No âmbito da procura de soluções de proteção biológica contra *P. madeirensis*, foi identificado um parasitoide encirtídeo, inicialmente referido como *Anagyrus* sp. próx. *sinope* Noyes & Menezes (Chong & Oetting 2006a). Chong & Oetting (2006a, 2006b, 2006c, 2006d, 2007a, 2007b, 2007c, 2007d) estudaram as características biológicas deste parasitoide e o seu potencial como agente de proteção biológica contra *P. madeirensis*. Esta espécie foi posteriormente descrita como *Anagyrus amnestos* Rameshkumar, Noyes & Poorani (Rameshkumar et al. 2012). Recentemente, *A. amnestos* foi identificada na Bacia do Mediterrâneo, nomeadamente na Turquia (Kaydan et al. 2016) e em Portugal (Franco et al., dados não publicados).

O presente trabalho surge na sequência de um trabalho anterior, realizado no Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro (CIFC), Oeiras, em que se identificaram as espécies de cochonilhas-algodão presentes em cafeeiro, nomeadamente *Planococcus citri* (Risso) e *P. madeirensis*, e se estudou a dinâmica de infestação de *P. citri* na cultura (Andrade, 2014; Andrade et al., 2017). As cochonilhas-algodão constituem um dos principais problemas fitossanitários dos cafeeiros mantidos nas estufas do CIFC, limitando grandemente a obtenção do material vegetal necessário às inoculações dos fungos aí estudados. O nosso

objetivo, neste trabalho, foi estudar a dinâmica de infestação de *P. madeirensis* em cafeeiro, em estufa, e a sua interação com o parasitoide *A. amnestos*, nomeadamente determinando a taxa de parasitismo e estudando, em laboratório, a sua especificidade em relação ao hospedeiro (Figura 1).



Figura 1 - Sinais de parasitismo em *Phenacoccus madeirensis*, Ampliação 20x Leica MZ6.
(Foto original de Elsa Borges da Silva).

2. Material e métodos

2.1. Monitorização de *Phenacoccus madeirensis* em cafeeiro

2.1.1. Caracterização da parcela

O trabalho experimental teve lugar nas estufas do Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro (CIFC)/, Instituto Superior de Agronomia (ISA)/Universidade de Lisboa (UL), localizado em Oeiras.

A monitorização da infestação dos cafeeiros com cochonilhas foi realizada numa das estufas do CIFC, com uma área aproximada de 528m², em 184 plantas do género *Coffea* (Figura 2), provenientes de diferentes origens geográficas: 24 plantas da espécie *C. canephora* Pierre ex A. Froehner; 3 plantas de *C. congensis* A. Froehner, 5 plantas de *C. eugenoides* S. Moore, 6 plantas de *C. excelsa* A. Chev., 2 plantas de *C. liberica* Hiern, 6 plantas de *C. racemosa* Lour., 1 planta de *C. salvatrix* Swynn & Philipson e em 54 plantas de *C. arabica* L., única espécie tetraplóide, sendo todas as outras referidas atrás, espécies diplóides. Foram ainda monitorizados 78 híbridos interespecíficos tetraplóides (ex. *C. arabica* x *C. canephora*).



Figura 2 - Planta de cafeeiro envasada, na parcela em que decorreu o estudo.
(Foto original do autor.)

Estes cafeeiros fazem parte de uma vasta colecção de genótipos de *Coffea* spp. com diferentes espectros de resistência às principais doenças do cafeeiro, tais como a ferrugem alaranjada e antracnose dos frutos verdes, que têm como agentes causais, respectivamente, os fungos *Hemileia vastatrix* Berkeley & Broome e *Colletotrichum kahawae* J.M. Waller & P.D. Bridge (A.P. Pereira & V. Várzea, com. pessoal).

Nas plantas de *C. arabica* podem ser encontradas as variedades botânicas Typica e Bourbon, assim como múltiplos descendentes (Caturra, Kent's, Geisha, Mundo Novo e Catuaí) e também vários cafeeiros (híbridos interespecíficos tetraplóides) provenientes de um cruzamento natural entre *C. arabica* e *C. canephora*, conhecido por Híbrido de Timor (HDT), amplamente cultivado em Timor-Leste (com resistência à ferrugem) e descendentes destes que têm sido estudados e utilizados em programas de melhoramento genético do cafeeiro em muitos países cafeicultores. Pode referir-se que mais de 90% de variedades comerciais resistentes à ferrugem alaranjada, disseminados por todo o mundo têm a sua origem em derivados de HDT, tais como CIFC 832 e CIFC 1343 (A.P. Pereira & V. Várzea, com. pessoal).

A estimativa da taxa de parasitismo pelo parasitoide *A. amnestos* foi efetuada numa outra estufa de cafeeiros, onde posteriormente se verificou existirem níveis de infestação mais

elevados de *P. madeirensis*.

Esta parcela apresenta condições semelhantes de temperatura e humidade às da estufa onde foram efetuados os estudos de monitorização da cochonilha.

2.1.2. Amostragem

O período de amostragem decorreu entre 23 de setembro de 2016 e 3 de março de 2017. A periodicidade das amostragens foi quinzenal, num total de 11 observações. De 3 de março a finais de outubro de 2017 não foi realizada qualquer observação, devido ao facto das plantas terem sido severamente podadas, com o objetivo de estimular a renovação da copa, na sequência de uma geada. Optou-se por realizar a última observação a 2 de novembro de 2017, para avaliar a recuperação da população de *P. madeirensis*, após a remoção da copa.

Em cada amostragem, todas as plantas da parcela foram observadas, para detetar a presença de cochonilhas-algodão, tendo-se registado as espécies existentes e respetivos estados de desenvolvimento, bem como o nível de infestação, com base no índice definido no estudo anterior (Andrade et al. 2017), com a seguinte escala: 0 – ausência de cochonilhas; 1 – infestação fraca (fêmeas isoladas, colónias ou ninfas isoladas); 2 – infestação moderada (presença de posturas, 1 e 2 instares em alguns ramos); 3 – infestação forte (presença de posturas e todos os estados de desenvolvimento nos órgãos de todos ou quase todos os ramos).

A taxa de parasitismo por *A. amnestos* foi determinada mensalmente, através da recolha de amostras de folhas infestadas com *P. madeirensis* (Figura 3). A dimensão da amostra variou em função da disponibilidade de plantas infestadas. As amostras colhidas eram transportadas em caixas de plástico, com arejamento. À chegada ao laboratório, efetuava-se a contagem de todos os indivíduos no 3º instar e de fêmeas adultas da cochonilha. Após a contagem, o material recolhido era devidamente catalogado, com registo de entrada e, por último, eram adicionadas batatas abroilhadas, como alimento (Figura 4). As amostras foram mantidas em câmara climatizada (24°C, 55-65% H.R., sem luz), até à emergência dos parasitoides. Uma vez contabilizados os parasitoides emergidos, a taxa de parasitismo foi calculada com base na seguinte fórmula:

$$\text{taxa de parasitismo (\%)} = \left(\frac{\text{número parasitoides emergidos}}{\text{número total de fêmeas adultas e 3º instares de } P. \text{ madeirensi}} \right) \times 100\% .$$

2.2. Especificidade do parasitoide *Anagyrus amnestos*

Pretendeu-se complementar o estudo de especificidade realizado por Chong & Oetting (2007c) (Quadro 1), comparando o comportamento de *A. amnestos* relativamente a diferentes hospedeiros potenciais, nomeadamente de três géneros distintos (*Phenacoccus*, *Planococcus* e *Pseudococcus*). Para o efeito, selecionaram-se, além de *P. madeirensis*, as seguintes espécies de cochonilhas-algodão, que podem assumir estatuto de praga em Portugal: *Phenacoccus peruvianus* Granara de Willink, *Planococcus ficus* (Signoret) e *Pseudococcus calceolariae* (Maskell).

Quadro 1 - Espécies de cochonilhas-algodão selecionadas por Chong & Oetting (2007c), no estudo de especificidade do parasitoide *Anagyrus amnestos*.

Género	Espécie
<i>Ferrisia</i>	<i>F. virgata</i>
<i>Phenacoccus</i>	<i>P. madeirensis</i>
<i>Phenacoccus</i>	<i>P. solani</i>
<i>Planococcus</i>	<i>P. citri</i>
<i>Pseudococcus</i>	<i>P. longispinus</i>
<i>Pseudococcus</i>	<i>P. viburni</i>

2.2.1. Origem do material biológico

A colónia de *P. madeirensis* foi obtida a partir de amostras colhidas em cafeeiro, no CIFC, em Oeiras. No caso do *P. peruvianus*, foram colhidas diversas amostras em *Bougainvillea*



Figura 3 - Cochonilha-algodão *Phenacoccus peruvianus* com sinais de parasitismo. Ampliação 15x Leica MZ6. (Foto original de Elsa Borges da Silva).

spp. (Alcântara/Lisboa, Birre/Cascais). Contudo, não foi possível iniciar a sua criação em laboratório, devido ao facto do material colhido ter apresentado uma elevada taxa de parasitismo natural (Figura 3). As colónias de *P. calceolariae* e *P. ficus* utilizadas no ensaio eram provenientes de criações mantidas no laboratório de Entomologia, do Instituto Superior de Agronomia, obtidas de laranjeira-doce (Silves) e vinha (Sardoal), respetivamente.

O parasitoide *A. amnestos* foi obtido a partir de colônias parasitadas de *P. madeirensis* colhidas no CIFC, em Oeiras.

2.2.2. Criação dos hospedeiros e do parasitoide

Todas as espécies de cochonilhas-algodão utilizadas foram criadas em câmaras climatizadas separadas ($25,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$, 55-65% H.R., sem luz), sobre batatas abrolhadas (*Solanum tuberosum* L.) (Figura 4). Antes da realização do ensaio biológico, foram isolados 3º instares de cada espécie, os quais foram mantidos em caixas ventiladas (25x15x12 cm) com alimento (batata abrolhada), nas mesmas condições ambientais referidas anteriormente, durante 5 a 7 dias, de modo a obter fêmeas jovens e não fecundadas.



Figura 4 - Amostra com presença de *P. madeirensis*.
(Foto original do autor).

No caso do parasitoide *A. amnestos*, a sua criação foi realizada em caixas ventiladas (10 cm de diâmetro, 14 cm altura) e igualmente em condições controladas de laboratório (24°C , 55-65% H.R., 14 horas de luz), com recurso a batatas abrolhadas infestadas com *P. madeirensis*. As caixas foram observadas cada 24 h de modo a capturar os adultos com idade inferior a 24 h que foram sendo utilizados no ensaio biológico.

2.2.3. Ensaio biológico

Os ensaios foram realizados, em placas de Petri (20 cm de diâmetro), em condições de laboratório ($19-22^\circ\text{C}$ e 55-65% H.R.), entre as 12h e as 19h e em condições de luz natural. Em cada repetição, o comportamento de *A. amnestos* era registado durante 30 minutos, cronometrando em segundos, a duração de cada tipo de comportamento. Consideraram-se os seguintes tipos de comportamento, segundo Heidari & Jahan (2000) e Karamaouna & Copland (2000): 1) procura (o parasitoide move-se aleatoriamente, movendo as antenas para cima e para baixo, repetidamente); 2) antenação (a fêmea examina uma cochonilha potencialmente hospedeira através de sucessivos batimentos com as antenas); 3) sondagem (a fêmea insere o ovipositor para recolher informação do interior do hospedeiro); 4) oviposição (a fêmea contorna o hospedeiro pelo sentido dos ponteiros do relógio ou no sentido oposto, contrai a extremidade do abdómen para posicionar o ovipositor e insere-o no hospedeiro); 5) limpeza e descanso (o parasitoide inicia a limpeza da armadura bucal, antenas, patas, asas e eventualmente, permanece imóvel). No caso da oviposição, quando necessário, foi contabilizado o tempo total, para além do limite dos 30 minutos.

Para cada espécie de cochonilha, foram efetuadas 40 repetições. Em cada repetição, uma fêmea de *A. amnestos* com menos de 24h, foi inserida num recipiente com uma solução açucarada e dois machos de *A. amnestos*, durante 48h, antes de iniciar o ensaio. A fêmea do parasitoide era então exposta, em placa de Petri, a 10 fêmeas de cochonilha-algodão, no estado adulto, da espécie selecionada para o ensaio (Figura 5).

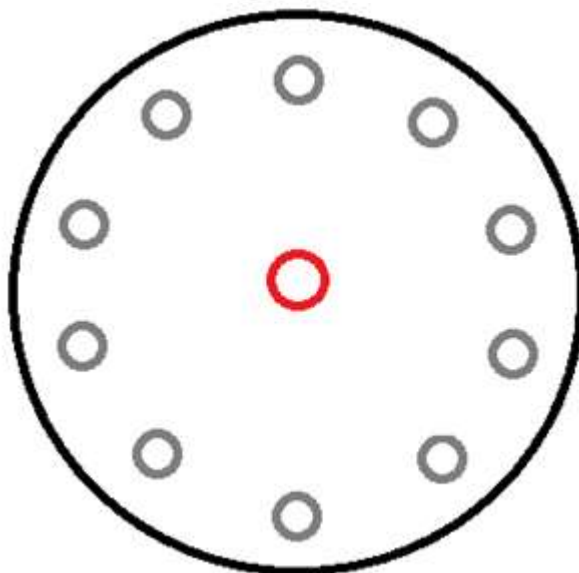


Figura 5 - Esquema da montagem do ensaio comportamental de *A. amnestos*. O círculo branco delimitado a preto representa uma placa de Petri de 20 cm; a cinzento estão representadas as fêmeas de cochonilha-algodão selecionadas para a ensaio; e a vermelho o local inicial de introdução do parasitoide.

Sempre que se registava a ocorrência de oviposição por parte do parasitoide, estas cochonilhas eram mantidas em placa de Petri, devidamente selada para evitar fugas, com alimento (batata abroilhada) e em câmara climatizada ($25,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, 55-65% R.H., 16L:8D), durante dez dias, para posteriormente observação de múmias e contabilização da presença de larvas de *A. amnestos* no seu interior, por dissecação. Após este período, as cochonilhas foram imersas em solução apropriada para clarificação (solução de cloralfenol: 51 g fenol + 49 g hidrato de cloral), de modo a tornar possível a visualização de ovos e larvas e respetivo estado (encapsulado ou não), com recurso a microscópio estereoscópico (40x ampliação; Leica MZ6).

Para cálculo da taxa de encapsulação agregada, recorreu-se à seguinte fórmula:

$$\text{taxa de encapsulação agregada (\%)} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ ovos ou larvas encapsuladas}}{\text{n}^{\circ} \text{ total de ovos/larvas do parasitoide}} \times 100$$

Para cálculo da taxa de encapsulação efetiva, recorreu-se à seguinte fórmula:

$$\text{taxa de encapsulação efetiva (\%)} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ hospedeiros c. todos os ovos/larvas encapsulados}}{\text{n}^{\circ} \text{ de hospedeiros parasitados}} \times 100$$

2.4. Análise de resultados

Os resultados referentes à monitorização de cochonilhas-algodão em cafeeiro foram analisados graficamente com base no índice médio de infestação e da percentagem de plantas infestadas.

No caso dos ensaios de comportamento de *A. amnestos*, determinou-se a duração média de cada comportamento do parasitoide, para cada uma das espécies de cochonilhas, com os seus respetivos erros padrão. No caso das fêmeas parasitadas, foi calculado o número médio de larvas do parasitoide por hospedeiro (número total de larvas observadas/número total de fêmeas parasitadas) e taxa de encapsulação agregada (número de ovos encapsulados/número total de ovos postos pelo parasitoide x 100%).

A média da duração de cada tipo de comportamento de *A. amnestos* foi comparada entre espécies de hospedeiros, através de Análise Univariada de Variância (ANOVA), seguida de teste de comparação de médias de Tukey HSD, utilizando o programa IBM SPSS 20.0 para o Windows (IBM Corporation, Armonk, New York, USA).

Para a realização dos gráficos de barras e gráficos de linhas utilizou-se o programa *Microsoft Office Excel 2010*.

3. Resultados e discussão

3.1. Monitorização de cochonilhas-algodão em cafeeiro

A percentagem de plantas com cochonilhas-algodão variou entre 0,6% e 56,9%, tendo o máximo e mínimo sido registados em setembro de 2016 e fevereiro de 2017, respetivamente (Figura 6). Verificou-se uma redução gradual da percentagem de plantas infestadas, entre setembro e janeiro, muito possivelmente resultante de efeitos diretos e indiretos da temperatura. É de esperar que a redução da temperatura afete diretamente o desenvolvimento, fecundidade e sobrevivência das cochonilhas-algodão (Franco et al. 2009). As baixas temperaturas verificadas em dezembro e janeiro de 2016 (segundo os dados recolhidos pelo Instituto Português do Mar e Atmosfera, o valor médio das temperaturas médias, máximas e mínimas foi, respetivamente, 10,4°C, 15,3°C e 5,6°C, em dezembro de 2016 e 8,3°C, 13,5°C e 3,0°C, em janeiro de 2017). Na ausência de sistema de aquecimento, na estufa em estudo, a parte vegetativa de muitas plantas foi afetada e, consequentemente, as populações de cochonilhas-algodão. O nível mais baixo de infestação registou-se a 17 de fevereiro, pouco depois da poda severa a que as plantas foram submetidas, com o objetivo de estimular o crescimento de nova rebentação, após a destruição parcial ou total da vegetação, em resultado do efeito das baixas temperaturas.

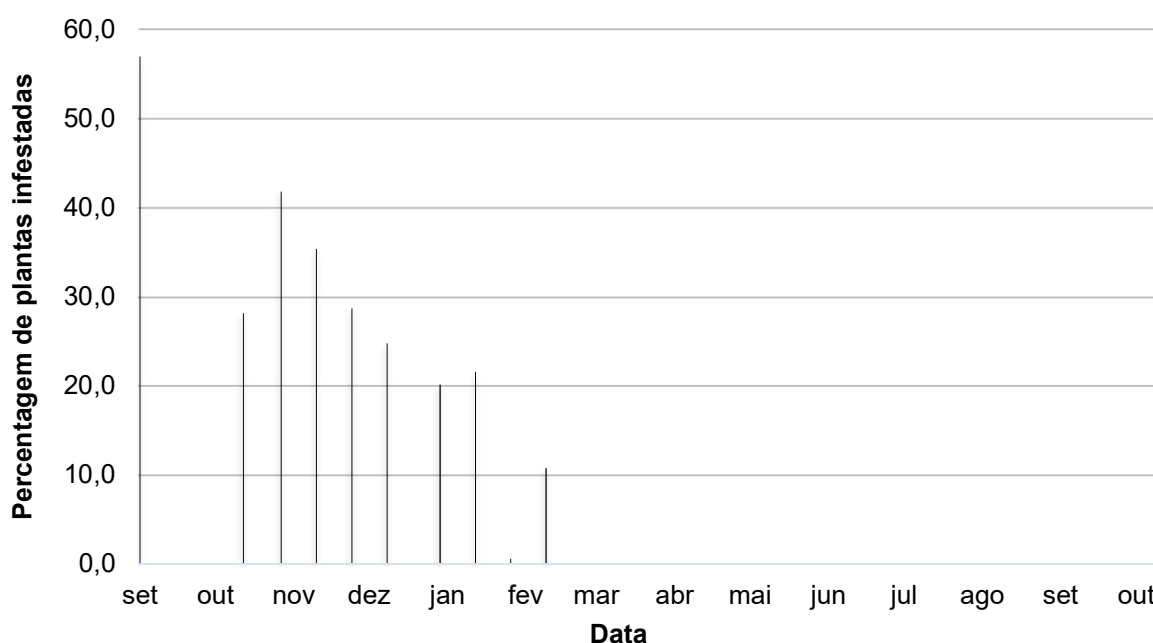


Figura 6 - Evolução da percentagem de plantas infestadas com cochonilhas-algodão, durante o período de amostragem (setembro de 2016 a novembro de 2017).

O índice médio de infestação variou entre 0,01 e 0,75, valores registrados a 17 fevereiro de 2017 e 23 de setembro de 2016, respectivamente (Figura 7). O padrão de variação do índice de infestação foi semelhante ao observado na percentagem de plantas infestadas, devido à elevada correlação observada entre estas duas variáveis (Figura 8).

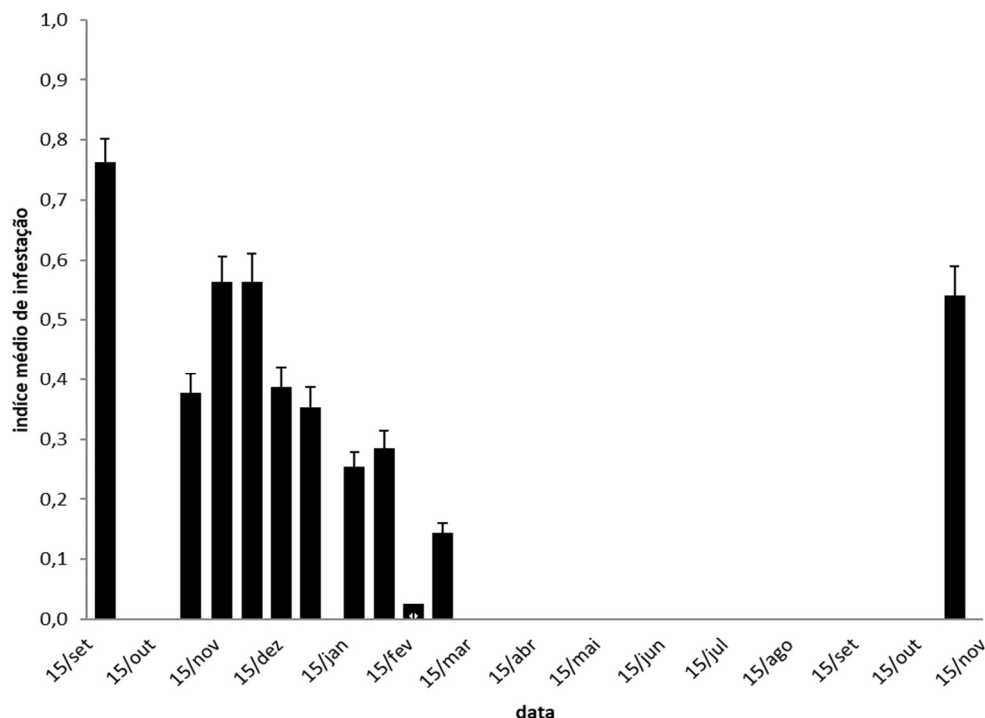


Figura 7 - Índice médio de infestação de cochonilhas-algodão ao longo do período de observação.

Resultado idêntico foi observado em duas das três variedades de cafeeiro estudadas por Andrade et al (2017). No entanto, os resultados obtidos por Andrade et al. (2017) sugerem que o índice de infestação reflete melhor a dinâmica de infestação das cochonilhas-algodão, do que a percentagem de plantas infestadas, nomeadamente quando os valores desta última variável são elevados.

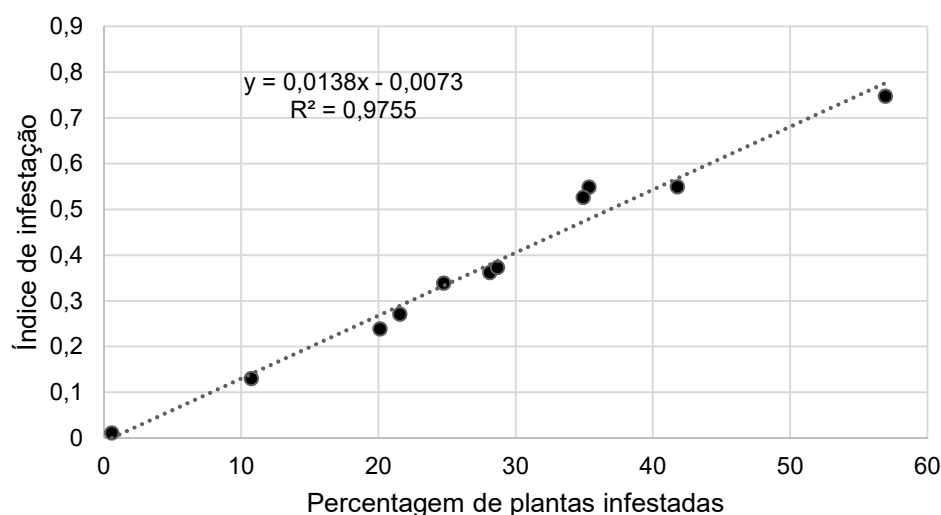


Figura 8 - Retra da regressão linear entre o índice de infestação (eixo das ordenadas) e a percentagem de plantas infestadas (eixo das abcissas).

Foram identificadas três espécies de cochonilhas-algodão na parcela em estudo, nomeadamente *P. citri*, *P. madeirensis* e *Pseudococcus longispinus* (Targioni Tozzetti). Esta última espécie não tinha sido observada por Andrade et al. (2017). *Planococcus citri* foi a espécie mais frequente, com mais de 70% das observações, na maior parte das amostragens (Figura 9). *Phenacoccus madeirensis* foi a segunda espécie mais frequente, representando entre 5% e 23%, excepto a 17 de fevereiro, em que foi a única espécie observada, mas apenas numa planta. A frequência relativa de *P. longispinus* variou entre 0 e 10%. Estes resultados confirmam o domínio de *P. citri*, em cafeeiro, nas estufas do CIFC, também observado por Andrade et al. (2017), muito embora neste último caso, esta espécie foi a única cochonilha-algodão presente na parcela estudada.

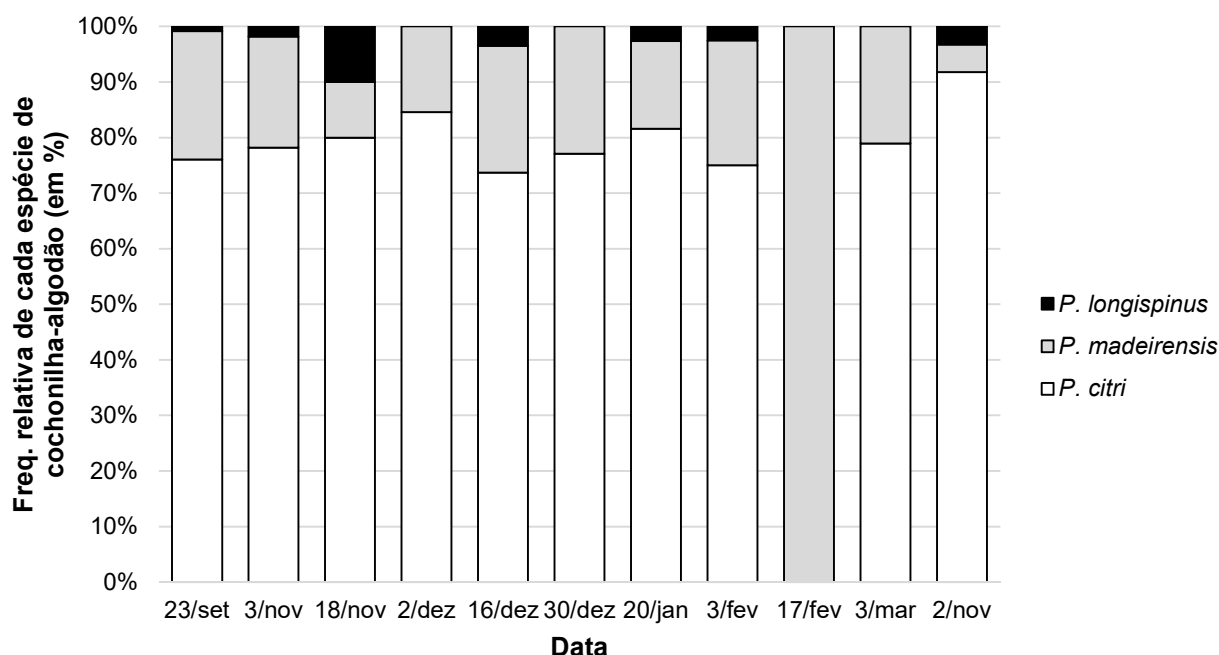


Figura 9 - Evolução da frequência relativa de cada uma das três espécies de cochonilhas-algodão identificadas na parcela de café em estudo: *Planococcus citri*, *Phenacoccus madeirensis*, *Pseudococcus longispinus*.

As três espécies de cochonilhas-algodão surgiram, por vezes, associadas na mesma planta. A associação mais frequente foi entre *P. citri* e *P. madeirensis* (4,4% a 23/09/2016; 3,8% a 03/11/2016; 1,3% a 18/11/2016; 7,6% a 16/12/2016; 4,6% a 30/12/2016; 2,7% a 20/01/2017; 2,6% a 03/02/2016), seguida de *P. citri* e *P. longispinus* (0,9% a 23/09/2016; 1,9% a 03/11/2016; 2,6% a 18/11/2016; 1,7% a 02/11/2017). A associação *P. madeirensis* e *P. longispinus* ocorreu uma única vez (1,3% a 18/11/2016).

Não obstante a eliminação da parte vegetativa, registrada após a poda severa realizada em fevereiro de 2017, os resultados sugerem que a população de cochonilhas-algodão voltou a colonizar a cultura, tendo atingido pouco tempo depois (3 março) cerca de 11% de plantas infestadas e, em 2 de novembro, 35%, valor superior ao registrado na mesma data, no ano anterior (28%) (Figura 6). Estes resultados sugerem uma elevada capacidade de ressurgimento das populações de cochonilhas-algodão, na cultura do café em estufa, em particular no que diz respeito a *P. citri*. A amostragem efetuada em novembro de 2017 indica um aumento da frequência relativa desta espécie, por comparação com a amostragem de novembro de 2016 (Figura 9). Dada a relativa rapidez da resposta observada, no ressurgimento das populações de cochonilhas-algodão, após a poda, é provável que a fonte de recolonização das plantas tenha sido a população residual existente no solo e nas raízes, no interior dos vasos.

3.2. Taxa de parasitismo de *Phenacoccus madeirensis*

A taxa de parasitismo por *A. amnestos*, observada nas amostras de *P. madeirensis*, variou entre 1,1% e 100%, correspondendo a um valor médio de 19% (Quadro 2). Chong & Oetting (2007c) referem uma taxa média de parasitismo de 42%, em condições de laboratório. A elevada variação no nível de parasitismo, observada no presente estudo, está possivelmente relacionada com alterações da atividade do parasitoide, influenciadas pelas condições ambientais, nomeadamente em termos de temperatura, bem como da estrutura populacional de *P. madeirensis*, uma vez que a taxa de parasitismo varia em função do estado de desenvolvimento do hospedeiro.

Quadro 2 - Taxa de parasitismo (%) por *Anagyrus amnestos* em amostras de *Phenacoccus madeirensis* colhidas em cafeeiro (A= número da amostra), no CIFC, em Oeiras (N= fêmeas N3 e adultas de *P. madeirensis*).

Data	N	Nº parasitoides emergidos	Taxa de parasitismo
23/09/2016 – A1	38	1	2,6
23/09/2016 – A2	87	1	1,1
23/09/2016 – A3	20	8	40,0
20/10/2016 – A1	33	1	3,0
20/10/2016 – A2	34	34	100,0
20/10/2016 – A3	39	7	17,9
18/11/2016 – A1	33	2	6,1

3.3. Estudo comportamental do parasitoide *Anagyrus amnestos*

Das três espécies de cochonilhas-algodão a que o parasitoide foi exposto, *A. amnestos* só parasitou *P. madeirensis*, tendo rejeitado como hospedeiros *P. ficus* e *P. calceolariae* (Figuras 10 e 11, Quadro 3). Estes resultados suportam a hipótese de *A. amnestos* ser um parasitoide altamente específico, como sugerido por Chong & Oetting (2007c). No presente trabalho, foi estudada pela primeira vez a interação do parasitoide com *P. ficus* e *P. calceolariae*. Neste estudo e em Chong & Oetting (2007c), das oito espécies de cochonilhas-algodão estudadas, nomeadamente *P. citri*, *P. ficus*, *P. longispinus*, *P. calceolariae*, *Pseudococcus viburni* (Signoret), *Ferrisia virgata* (Cockerell), *P. madeirensis* e *P. solani*, só *P. madeirensis* foi aceite pelo parasitoide como hospedeiro.

O comportamento observado de *A. amnestos* foi claramente diferente entre *P. madeirensis* e as duas espécies de cochonilhas-algodão rejeitadas pelo parasitoide. Em termos relativos, a principal diferença reside na proporção do tempo de procura, que no

caso de *P. madeirensis* representou cerca de 47%, em comparação com mais de 80%, em *P. ficus* e *P. calceolariae*. A percentagem de tempo de antenação também permite diferenciar a espécie hospedeira, uma vez que no caso de *P. madeirensis* este comportamento (6,5%) representou cerca de três a quatro vezes mais a percentagem de tempo alocado pelo parasitoide, no caso da interação com *P. calceolariae* (2,1%) e *P. ficus* (1,5%), respetivamente (Figura 10).

Este resultado sugere que no processo de reconhecimento e aceitação do hospedeiro, por parte do parasitoide, através de antenação, existem duas etapas sucessivas. Numa primeira etapa, o parasitoide recolhe informação química da superfície do tegumento da cochonilha, que lhe permite distinguir um hospedeiro de um não hospedeiro. No caso de se tratar de um não-hospedeiro, o parasitoide rejeita a cochonilha e o processo de seleção termina. No caso de ser um hospedeiro, o parasitoide prolonga o processo de reconhecimento, recolhendo informação adicional, possivelmente, relacionada com o estado do hospedeiro, que poderá ser complementada com informação obtida da hemolinfa, através de sondagem com o ovipositor.

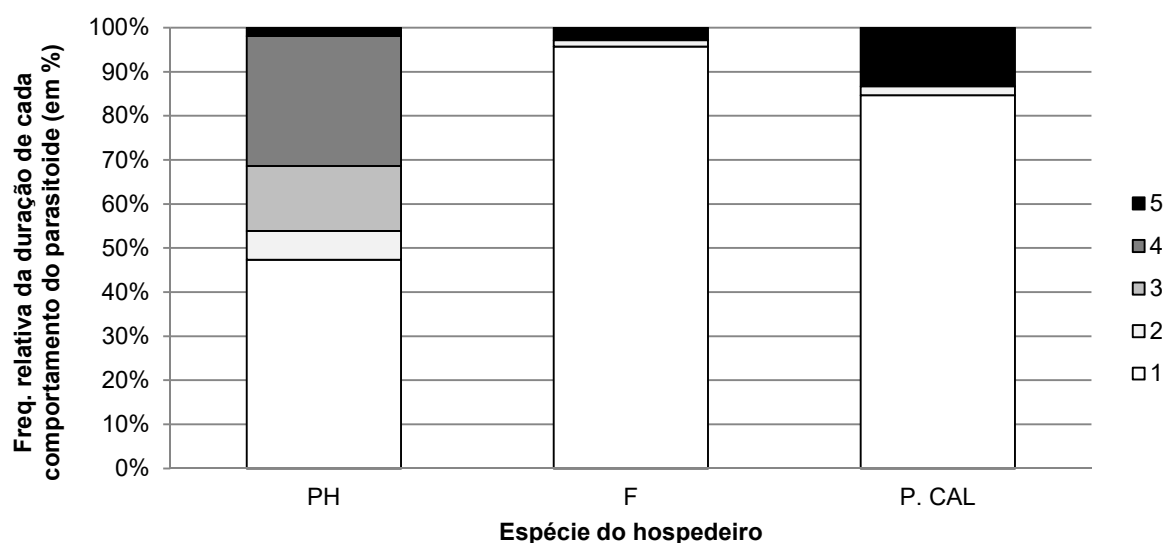


Figura 10 - Frequência relativa da duração de cada comportamento de localização e reconhecimento do hospedeiro por parte do parasitoide *Anagyrus amnestos* [1 – procura; 2 – antenação; 3 – sondagem; 4 – oviposição; 5- limpeza e descanso], quando exposto a três espécies distintas de cochonilhas-algodão [PH - *Phenacoccus madeirensis*, F - *Planococcus ficus*, P.CAL - *Pseudococcus calceolariae*].

A duração média do comportamento de procura de *A. amnestos* variou significativamente ($p < 0,05$) entre as três espécies de cochonilhas-algodão estudadas, tendo o valor máximo e mínimo sido registado em *P. ficus* e *P. madeirensis*, respetivamente (Quadro 3), o que sugere que o parasitoide foi mais eficiente na localização de *P. madeirensis*, em comparação com as duas outras espécies de cochonilhas-algodão. Esta maior eficiência poderá estar relacionada

com o reconhecimento de componentes voláteis emitidos pela espécie hospedeira. A duração do comportamento de antenação em *P. madeirensis* foi significativamente superior à registrada em *P. calceolariae* e *P. ficus*, não existindo diferenças significativas entre estas duas últimas espécies de cochonilhas (Quadro 3). A duração média do tempo de descanso e limpeza por parte do parasitoide foi mínima no caso de *P. madeirensis* e máxima para *P. calceolariae*, não se tendo observado diferenças significativas entre *P. ficus* e *P. madeirensis* (Quadro 3).

Quadro 3 - Duração média (\pm erro padrão) dos comportamentos de seleção do hospedeiro (em segundos), de fêmeas de *Anagyrus amnestos*, quando expostas a três espécies de cochonilhas-algodão de três gêneros diferentes, em ensaios biológicos, sem escolha, realizados em placa de Petri, durante 30 minutos.

Tipo de comportamento	Espécie*		
	<i>Pseudococcus calceolariae</i>	<i>Planococcus ficus</i>	<i>Phenacoccus madeirensis</i>
	(N=40)	(N=40)	(N=44)
Procura	1526,6 \pm 61,4 b	1722,4 \pm 23,3 a	906,1 \pm 68,2 c
Antenação	37,5 \pm 15,8 b	27,2 \pm 9,2 b	125,2 \pm 12,2 a
Sondagem	0	0	282,3 \pm 61,0
Oviposição	0	0	565,2 \pm 87,5
Limpeza e descanso	238,9 \pm 62,1 a	50,4 \pm 19,2 b	36,1 \pm 12,5 b

*médias com a mesma letra, dentro da mesma linha, não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$; Tukey HSD test).

Na interação entre *P. madeirensis* e *A. amnestos*, o parasitoide fez postura em 38 das 44 repetições. Num total de 49 cochonilhas parasitadas, foi possível observar larvas de *A. amnestos* em 22 (Figura 11). O número de larvas do parasitoide por hospedeiro variou entre 1 e 10, com uma média de 2,4.



Figura 11 - Cochonilha-algodão *Phenacoccus madeirensis* Green parasitada por *Anagyrus amnestos*, Ampliação 15x Leica MZ6. (Foto original de Elsa Borges da Silva).

Em termos de resposta do sistema imunitário por parte da espécie *P. madeirensis* após a oviposição, representada pela encapsulação de ovos, já que não existiu nenhuma observação de larvas encapsuladas de *A. amnestos*, temos uma taxa de encapsulação agregada de 2,2% e uma taxa de encapsulação efetiva de 4,1%.

4. Conclusões

A monitorização das cochonilhas-algodão, na parcela estudada de cafeeiro em estufa, do CIFC, em Oeiras, mostrou que *P. madeirensis* é uma espécie de importância secundária, sendo a espécie dominante *P. citri*. *Pseudococcus longispinus*, identificada pela primeira vez nas estufas do CIFC, assumiu importância residual.

Os resultados obtidos permitiram complementar a informação existente sobre a dinâmica de infestação das cochonilhas-algodão em cafeeiro, com base num estudo anterior (Andrade et al. 2017), realizado entre janeiro e junho de 2014, evidenciando um decréscimo gradual do nível de infestação, a partir de setembro.

O parasitoide *A. amnestos* evidenciou uma taxa de parasitismo variável, oscilando entre 1% e 100%, e com um valor médio de 19%. O estudo de especificidade corroborou a hipótese de se tratar de um parasitoide altamente seletivo, que aparentemente só parasita *P. madeirensis*, tendo rejeitado, como hospedeiros, as duas espécies de cochonilhas-algodão estudadas, i.e., *P. ficus* e *P. calceolariae*. Os resultados indicam que *A. amnestos*, durante a antenação, consegue diferenciar entre hospedeiros e não-hospedeiros, possivelmente através de informação química associada às ceras do tegumento das cochonilhas-algodão. A análise do comportamento de localização e aceitação do hospedeiro poderá ser utilizada para avaliar o grau de especificidade de outros parasitoides do género *Anagyrus*.

5. Referências bibliográficas

- Andrade, A.C.D., 2014. Cochonilhas-algodão associadas ao cafeeiro em estufas. ISA/UL. Lisboa: ISA.
- Andrade, A.C.D., Silva, E., Pereira, A.P., Franco, J.C., 2017. Identificação e monitorização de cochonilhas-algodão (Hemiptera, Pseudococcidae) associadas ao cafeeiro em estufa. *Revista de Ciências Agrárias*. **40 (3)**, 616-629.
- Beltrà, A., Soto, A., 2011. New records of mealybugs (Hemiptera: Pseudococcidae) from Spain. *Phytoparasitica*. **39(4)**, 385–387.
- Ben-Dov, Y., 2016. *Scalenet*. Obtido de scalenet.info/static/scaledb/flatcat/Pseudococcidae.htm, consultado a 27 de setembro de 2017.
- Bugila, A.A.A., 2013. Host-parasitoid relationships of *Anagyrus* sp. near *pseudococci* (Girault), (Hymenoptera, Encyrtidae), as a basis to improve biological control of pest mealybugs (Hemiptera, Pseudococcidae). ISA/UL. Lisboa: ISA.
- Canário, D.V.P., 2016. A problemática das cochonilhas-algodão em cultura protegida de hortícolas na Região Oeste. ISA/UL. Lisboa: ISA.
- Chong, J.H. & Oetting, R.D., 2006a. Influence of temperature and mating status on the development and fecundity of the mealybug parasitoid, *Anagyrus* sp. nov. nr. *sinope* Noyes and Menezes (Hymenoptera: Encyrtidae). *Environmental Entomology*, **35(5)**, 1188–1197.
- Chong, J.H., Oetting, R.D., 2006b. Functional response and progeny production of the Madeira mealybug parasitoid, *Anagyrus* sp. nov. nr. *sinope*: The effects of host and parasitoid densities. *Biological Control*. **39(3)**, 320-328.
- Chong, J.H., Oetting, R.D., 2006c. Influence of temperature, nourishment, and storage period on the longevity and fecundity of the mealybug parasitoid, *Anagyrus* sp. nov. nr. *sinope* Noyes and Menezes (Hymenoptera: Encyrtidae). *Environmental Entomology*. **35**, 1198–1207.
- Chong, J.H., Oetting, R.D., 2006d. Host stage selection of the mealybug parasitoid, *Anagyrus* spec. nov. near *sinope*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. **121**, 39–50.
- Chong, J.H., Oetting, R.D., 2007a. Progeny fitness of the mealybug parasitoid *Anagyrus* sp. nov. nr. *sinope* (Hymenoptera: Encyrtidae) is affected by brood size, sex ratio and host stage. *Florida Entomologist*. **90**, 656–664.
- Chong, J.H., Oetting, R.D., 2007b. Foraging behaviour of the mealybug parasitoid *Anagyrus* sp. nov. nr. *sinope* (Hymenoptera: Encyrtidae). *Journal of Entomological Science*. **42**, 481–495.

- Chong, J.H., Oetting, R.D., 2007c. Specificity of *Anagyrus* sp. nov. nr. *sinope* and *Leptomastix dactylopii* for six mealybug species. *BioControl*. **52**, 289–308.
- Chong, J.H., Oetting, R.D., 2007d. Functional response and progeny production of the Madeira mealybug parasitoid, *Anagyrus* sp. nov. nr. *sinope*: The effect of host stage preference. *Biological Control*. **41**, 78–85.
- Franco, J. C., Zada, A., Mendel, Z., 2009. Novel Approaches for the Management of Mealybug Pests. Em I. Ishaaya, A. R. Horowitz, I. Ishaaya, A. R. Horowitz (Eds.) *Biorational Control of Arthropod Pests*. Springer, Dordrecht, 233-278.
- Franco, J.C., Russo, A., Marotta, S., 2011. An annotated checklist of scale insects (Hemiptera: Coccoidea) of Portugal, including Madeira and Azores Archipelagos. *Zootaxa*. **3004**, 1–32.
- Heidari, M., Jahan, M., 2000. A Study of Ovipositional Behaviour of *Anagyrus pseudococci* a Parasitoid of Mealybugs. *Journal of Agricultural Science and Technology*. **1(2)**, 49–53.
- Karamaouna, F., Copland, M., 2000. Oviposition behaviour, influence of experience on host size selection, and niche overlap of the solitary *Leptomastix epona* and the gregarious *Pseudaphycus flavidulus*, two endoparasitoids of the mealybug *Pseudococcus viburni*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. **97(3)**, 301–308.
- Kaydan M.B., Hayat M., Çalışkan A.F., Ulusoy, M.R., 2016. New record of a parasitoid (Hymenoptera: Encyrtidae) of the Madeira mealybug, *Phenacoccus madeirensis* Green (Hemiptera: Pseudococcidae) from Turkey. *Journal of the Entomological Research Society*. **18**, 107-112.
- Miller, D.R., Miller G.L., Watson, G.W., 2002. Invasive species of mealybugs (Hemiptera: Pseudococcidae) and their threat to U.S. agriculture. *Proceedings of the Entomological Society of Washington*. **104**, 825-836.
- Pellizari G., Germain J.F., 2010. Scales (Hemiptera, Superfamily Coccoidea). *BioRisk*. **4**, 475-510.
- Rameshkumar A., Noyes J. S., Poorani J., Chong, J. H., 2012. Description of a new species of *Anagyrus* Howard (Hymenoptera: Chalcidoidea: Encyrtidae), a promising biological control agent of the invasive Madeira mealybug, *Phenacoccus madeirensis* Green (Hemiptera: Sternorrhyncha: Pseudococcidae). *Zootaxa*. **3717**, 76-84.
- Williams, D.J., Granara de Willink, M.C.G., 1992. *Mealybugs of Central and South America*. CAB International, Wallingford, UK, 635 pp.